

ロクショウグサレキン (*Chlorociboria aeruginosa* complex) 由来の色素 (Xylindein) の抽出とその生理学的特性

前田 みずき*・山内 健*・大島 賢治*・下村 雅人*・宮内 信之助*
迎 勝也**・坂木 剛***・柴田 昌男***・若松 国光***

Extraction of Xylindein from *Chlorociboria aeruginosa* complex and its biological characteristics

Mizuki MAEDA*, Takeshi YAMAUCHI*, Kenji OSHIMA*, Masato SHIMOMURA*, Shinnosuke MIYAUCHI*
Katsuya MUKAE**, Tsuyoshi SAKAKI***, Masao SHIBATA***, and Kunimitsu WAKAMATSU****

Abstract : Xylindein (XL) was effectively extracted from wood rotted by *Chlorociboria aeruginosa* complex using a hot-compressed-water; in particular, with aqueous NaOH solution. The blue color of XL became red by ultraviolet irradiation, while XL was blue. It was estimated that the phenolic hydroxyl groups of XL were acylated by ultraviolet irradiation, because the acetyl XL was red. The effect of XL on the growth of Chinese Hamster Ovary cells was examined in the medium supplemented by XL. In the presence of XL, the cell growth in the medium was much retarded. The retardation was reduced when the irradiated XL was used.

Key words : *Chlorociboria aeruginosa* complex, hot-compressed-water, ultraviolet irradiation, Xylindein

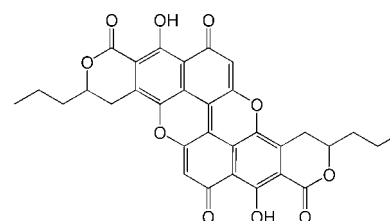
1. はじめに

一般的に、生物の1次代謝産物は生物の生存に必須の物質であり、その生理学的特性は解明されているが、2次代謝産物については、不明なものが多い。きのこ類の色素についてもその生理学的特性はほとんど解明されていない。

Xylindein (XL)⁽¹⁾は木材腐朽菌の1種、子囊菌類のロクショウグサレキン (*Chlorociboria aeruginosa* complex), ロクショウグサレキンモドキ (*C. aeruginascens*) などから分離された美しい青緑色素である。高橋¹⁾は、このXLを含む腐朽木材を染色に応用し、金子ら²⁾は、人工栽培法によって得たロクショウグサレキンから、青緑色素を得た。一方、その構造はBlackburnら³⁾およびEdwardsら⁴⁾によって明らかにされ、その絶対構造はSaikawaら⁵⁾によって明らかにされた。

しかしながら、その生理学的特性については全く検討されていない。本研究は、はじめにロクショウグサレキン complex (以下ロクショウグサレキン) によって腐朽した木材から、セルロースバイオマスの抽出で検討さ

れている加圧熱水法^{6) 7)}によって、XL色素を抽出分離する方法を検討した。続いて抽出した色素の生理学的特性、特に動物細胞の成長に対する影響を検討した。



xylindeinの化学構造

2. 実験方法

2. 1 試料

ロクショウグサレキンは1999~2001年の秋、新潟県東頸城郡松之山町の広葉樹林内で採取した。XL色素は、ロクショウグサレキンによって腐朽した木材から抽出分離した。すなわち、腐朽木材を鋸を用いて出来るだけ細かに切り刻み、この木屑を乳鉢でさらに細かく粉碎し、1mm角の網目を通して試料とし、2. 3、2. 4に従って分離した。

2. 2 試薬

アセトン、亜硫酸ナトリウム、メタノール、エーテ

原稿受付：平成15年5月20日

*長岡技術科学大学工学部

**九州産業大学工学部

***産業技術総合研究所九州センター

****福岡女子大学人間環境学部

ル、エタノール、クロロホルム、水酸化ナトリウム、炭酸水素ナトリウムはナカライテスク(株)製特級をそれぞれそのまま用いた。

2. 3 アルカリ溶液による抽出

アルカリ溶液による抽出手順を図1に示す。はじめに、粉碎された木材0.2 g、水酸化ナトリウム0.5 gと蒸留水10mlをナスフラスコに入れ30分間煮沸した。冷却後ろ過しそのろ液を抽出液Ⅰとし、残さはナスフラスコに戻し、新たに水酸化ナトリウム0.5 g、亜硫酸ナトリウム0.05 gと蒸留水10mlを入れて30分間煮沸した。これをろ過し、ろ液を抽出液Ⅱとした。その残さを再びナスフラスコに戻し、新たに水酸化ナトリウム0.5 g 亜硫酸ナトリウム0.05 gと蒸留水10mlを入れて30分間煮沸した。このろ過後の抽出液を抽出液Ⅲとした。抽出液ⅡとⅢとを合わせ、酢酸を加えpH 5～6に中和し、これを抽出液Ⅳとした。

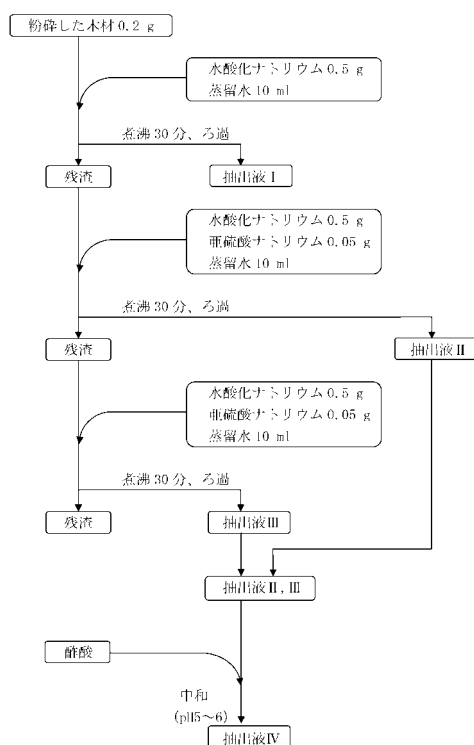


図1 ロクショウグサレキン中の色素の抽出手順

2. 4 加圧熱水による抽出

坂木ら⁶⁾の方法に準じて行った。熱水流通式反応器を図2に示す。2. 1の処理で得た青緑色の色素を含む木粉0.7 gを、反応器に仕込み、系内を一定圧20kg/cm²に保圧弁で調整した。その後、塩浴中で加熱された水

または0.01N NaOH 水溶液を高圧ポンプで反応器に流通させた。なお、熱水の流水速度は10ml/min、熱水温度は塩浴温度によって制御した。

2. 5 紫外・可視分光光度計測定

紫外可視・分光光度計（島津製作所(株)製UV-3100PC型）を用い、各試料について波長領域350～800nmの範囲で測定した。用いた石英セル厚は1 cmである。

2. 6 紫外線照射

光源として254nmの紫外線出力が最大のランプ（東芝(株)製、GL-15、15W）を使用した。クロロホルム溶液試料を石英製の角形セル（1.0×1.0×4.5cm）に入れて栓をし、各時間照射した。

2. 7 FTIR測定

フーリエ変換赤外分光光度計（日本電子(株)製、JTR-700 (FT-IR)）で測定した。

2. 8 アセチル化処理

クロロホルム抽出溶液から溶媒を留去し、その粉末にピリジン1 mlおよび無水酢酸1 mlを順に加えアセチル化した。その後反応を停止させるために以下の操作を行った。反応物を分液ロートに移してクロロホルムで希釈し、1 N HCl約5 mlで2回洗浄し、さらに5 %炭酸水素ナトリウム10mlおよび食塩水10mlを順に加え、それぞれ2回ずつ洗浄した。ろ過、乾燥後測定に供した。

2. 9 加メタノール分解処理

アセチル化処理後の色素と照射後の色素について加メタノール分解を行った。アセチル化処理後の色素の溶媒を留去し、メタノールに溶解させた。10%重量濃度に調整したナトリウムメチラート/メタノール溶液を約0.5ml加え、2時間反応させた。さらに、メタノール洗浄した弱酸性陽イオン交換樹脂で3時間反応させ中和した。また、照射後の色素も上記と同様に処理した。

2. 10 動物細胞増殖に対する影響

2. 10. 1 動物細胞培養培地

色素X LをDMSO溶媒に溶解し、色素濃度0.05、0.01、0.02、0.3、0.6、1.1mg/mlの6つの溶液を作製した。また、3時間紫外線照射した試料についても上記同様DMSO溶媒に溶かし、0.01、0.02、0.3、1.1mg/mlの4つの溶液を作製した。使用した動物細胞はチャイニーズ

ハムスター卵巣 (Chinese Hamster Ovary) から分離した繊維芽細胞株 (以後CHO細胞)。培地はHamF' 12培地。血清として培地の10%分のウシ胎児血清 (Fetal Bovine Serum;FBS) を添加した。

2. 10. 2 細胞増殖数の測定

各試料につき12枚の直径60mmガラスシャーレを用意し、1枚あたり培地 4 ml、約 5×10^4 cells/dishに調整した細胞混合液 1 mlおよび試料 50μ lを入れ、均一に混合した。この細胞入りシャーレを全部で36枚作製し、37℃で培養した。培養20時間後から12時間毎に、シャーレを各試料2枚ずつランダムに選抜し、細胞数を測定した。測定は6回行い、各点はシャーレ2枚の平均細胞数である。また、HeLa細胞株に対しては培地として、E-MEM培地を用いた。血清はCHO細胞と同じとした。

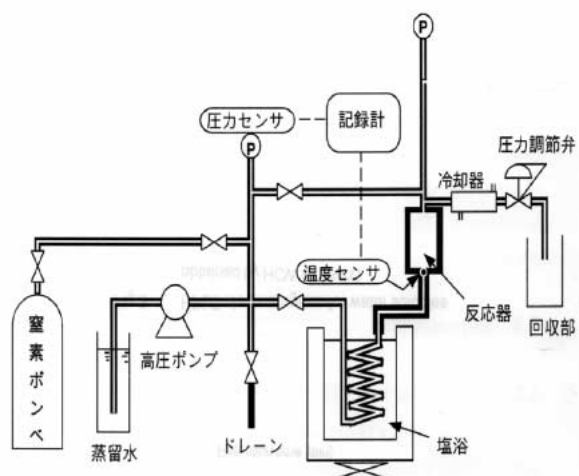


図2 熱水流通式反応器

抽出条件 圧力： 20 kg/cm^2 、溶媒：0.01 N NaOH水溶液、流水速度： 10 ml/min

3. 結果と考察

3. 1 アルカリ溶液による抽出

抽出液Ⅰには青緑色の色も混ざっているが全体茶褐色で、木材のタンニン由来の成分が多いものと予測され、この後の研究には使用しなかった。抽出液ⅡとⅢは濃緑青色であった。

抽出液ⅡとⅢを合わせて中和した液（抽出液Ⅳ）の可視吸収スペクトルを測定した。その極大吸収波長は595nmと647nmであった。これらはMedentsevら⁸⁾の報告している長波長側の吸収（603、647nm）に相当する。しかし短波長側にあるとされた吸収は確認出来なかつ

た。色素以外に木材成分も同時に抽出されているためと推定される。

3. 2 加圧熱水による抽出

水による抽出は最大温度を160℃、280℃まで上げ、0.01 N NaOHによる抽出は140℃まで上げ、それぞれ抽出を行った。図3に反応器内の時間経過に対する温度を示す。また、それぞれのフラクション番号 (Fr.1～Fr.5) も示す。

160℃までの抽出では、フラクション1 (100℃)、フラクション2 (125℃) はリグニンなどの木の成分を含み、褐色がかっていた。しかし、フラクション3、4、5では青色が強かった。一方、280℃までの抽出では、フラクション1 (100℃)、フラクション2 (160℃) はリグニンなどの木の成分を含み、褐色がかっていた。しかし、さらにフラクション3、4、5も再び褐色が濃くなり、色素を分離出来なかった。0.01 N NaOHでは140℃まで抽出したが、フラクション1 (100℃) から色素も抽出され、フラクション2、フラクション3で効果的に色素を抽出出来た。次に、このフラクション

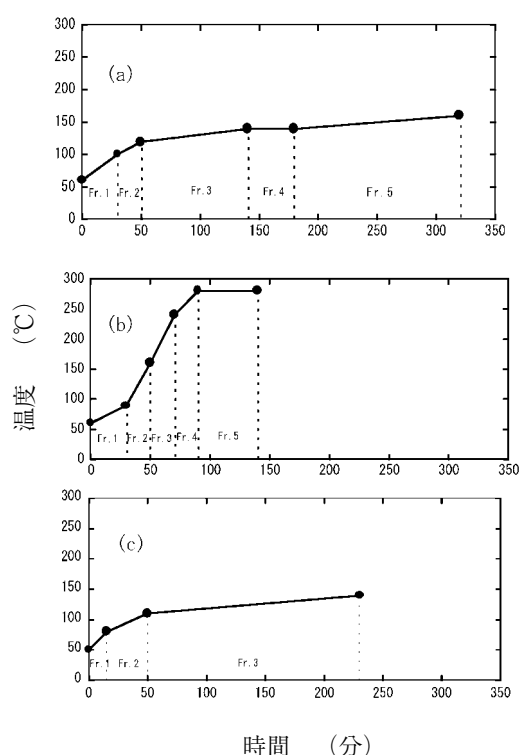


図3 加圧熱水抽出における熱水温度およびフラクション番号

a ; 温度：160℃ 溶媒：水、b ; 温度280℃ 溶媒：水、
c ; 温度160℃ 溶媒：0.1 N NaOH

3を1 N HClで中和した。この過程で色素が沈殿した。洗浄ろ過後、減圧乾燥して色素を得た。得られた色素量は使用した木材によって相当に異なるが、ロクショウグサレキンを含む乾燥木材あたりで、最大6%の色素を抽出することが出来た。加圧したアルカリ水溶液による色素抽出は工業的に期待出来る。

なお、有機溶媒による抽出はクロロホルムとアセトンで可能である。そこで、上記色素をクロロホルムで抽出精製した。クロロホルム抽出液の可視スペクトルを図4に示す。長波長側だけでなく、短波長側にも3本の吸収(385、404、425nm)が見られた。

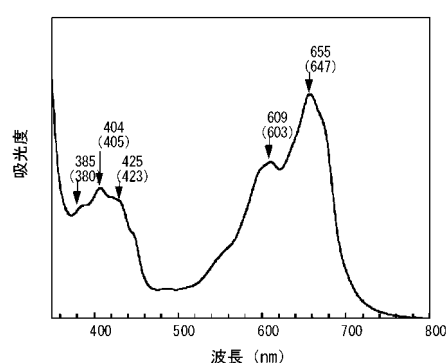


図4 XLをクロロホルム抽出した溶液の可視スペクトル

3. 3 光による変色と化学構造変化

ロクショウグサレキンを野外観察すると、光によって変色することがわかった。そこでこの変化を上記で抽出した色素を使って調べた。クロロホルム抽出液に紫外線を照射した時の可視吸収スペクトルの経時変化を図5に示す。照射1時間後、609、655nmの吸光度が減少し、短波長側の385、404、425nmの吸収も減少した。照射2時間後から550nm付近に新しいピークが現れた。肉眼的には赤紫色に変化した。しかし4時間後新しく現れたピークも減少し、色も淡黄色に変化した。

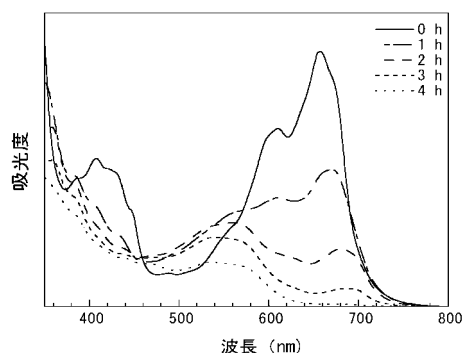


図5 クロロホルム抽出液に紫外線を照射した時の可視吸収スペクトルの経時変化

色素XLの化学構造変化について、次の原因が考えられる。

1. 紫外線によって構造全体が破壊される。

2. 基本骨格は変化せずに、側鎖のみが変化する。

1. については、FTIR測定により検討した。2. については、照射前後のXLをアセチル化処理、加メタノール分解処理後のXLを比較検討した。

未処理、紫外線照射、およびアセチル化処理後、これらのアセトン溶液のFT-IRスペクトルを測定し図6に示す。それぞれのIRスペクトルを比較すると、 3400 cm^{-1} の分子間水素結合(OH伸縮)に由来するピーク、 $2800\sim 3000\text{ cm}^{-1}$ の芳香族(C-H伸縮)に由来するピークおよび 1729 cm^{-1} のカルボン酸に由来するピークが一致した。これより基本的構造骨格は変化していないことがわかる。ただし、紫外線照射およびアセチル化処理後の試料では、 3400 cm^{-1} の分子間水素結合に由来するピークは減少した。さらにスペクトル変化を詳細に観察するために、波数範囲 $1000\sim 2000\text{ cm}^{-1}$ を拡大し、図7に示す。

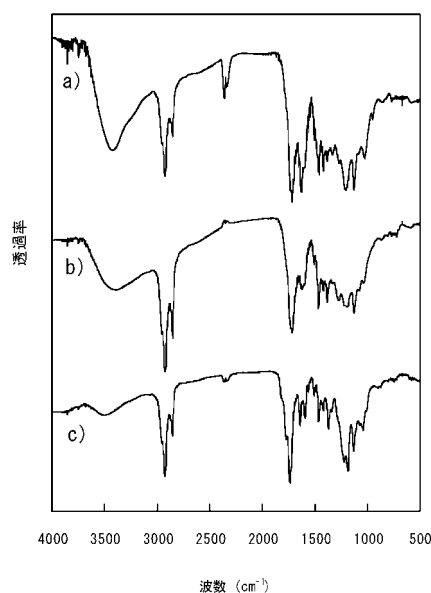


図6 紫外線照射およびアセチル化処理によるアセトン抽出溶液のFT-IRスペクトルの変化

a: 未処理、b: UV照射後、c: アセチル化後

未処理試料 1200 cm^{-1} の1本のピークが、照射後およびアセチル化処理後 1215 と 1193 cm^{-1} の2本のピークに分かれたが、前者は酢酸エステル $\text{C}-\text{C}(=\text{O})-\text{O}$ 伸縮、後者は $\text{O}-\text{C}\equiv\text{C}$ 逆対象伸縮に対応する。従って紫外線照射後の構造は、アセチル化した構造と類似していると推定させる。

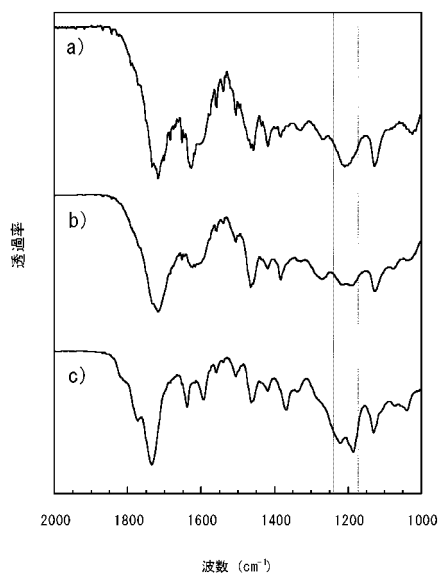


図7 紫外線照射、およびアセチル化処理によるアセトン抽出溶液のFT-IRスペクトルの変化
波数範囲：1000～2000cm⁻¹、
a：未処理、b：UV照射後、c：アセチル化後

上記の試料について可視吸収スペクトルを測定し、図8に示す。アセチル化処理した色素は鮮やかな赤紫色に変化するが、510、552nmに吸収が見られた。これと比較して紫外線照射処理では、510～580nmのブロードのスペクトルが観察された。従って照射後の色素構造の官能基の変化はアセチル化と確定できないが、Xylindein構造のエノール型の共鳴構造が変化していることからアセチル化が推定される。

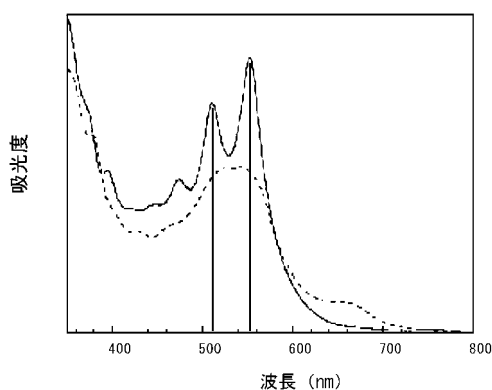


図8 紫外線照射、およびアセチル化処理後のアセトン抽出溶液の可視スペクトル
実線； アセチル化処理、破線；紫外線処理

一方、紫外線照射した色素およびアセチル化処理した試料の加メタノール分解処理後の可視スペクトルを

図9、10に示す。前者のスペクトルは大きく変化せず、後者はアセチル化前に戻った。

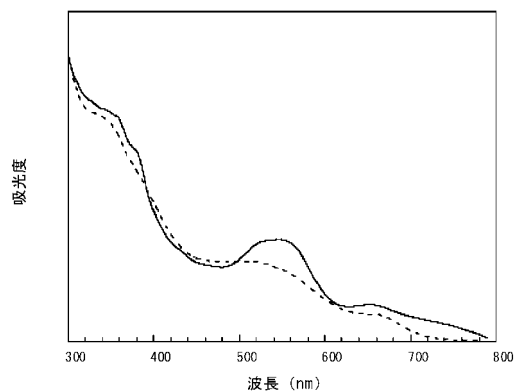


図9 紫外線照射した色素の加メタノール分解処理後の可視スペクトル
実線； 処理前、破線；処理後

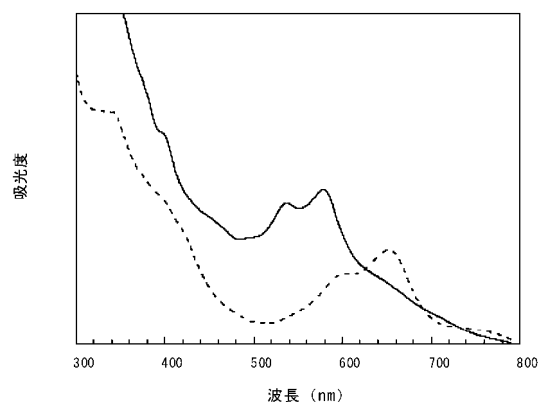


図10 アセチル化処理した試料の加メタノール分解処理後の可視スペクトル
実線； 処理前、破線；処理後

3. 4 色素 (Xylindein) 共存下の動物細胞 (CHO) の増殖

CHO細胞を含む培地に色素を添加し、細胞増殖変化を観察した。結果を図11に示す。XylindeinをCHO細胞に添加したとき、色素を添加しないコントロールと比較して細胞の増殖を抑制することが観測された。また、色素濃度の増加にともなって細胞増殖抑制も大きく、培養70時間のコントロールの細胞数を100としたとき、色素濃度0.005、0.01、0.02、0.3、0.6、1.1mg/ml添加したとき、それぞれ7、28、83、86、89%の抑制率を示した。特に色素濃度0.01mg/mlと0.02mg/mlの間に21%の細胞抑制を示した。紫外線照射後の色素を上記同様に0.01、0.02、0.3、1.1mg/ml添加して、CHO細胞増殖を観察した。その結果を図12に示す。XylindeinをCHO細胞に添

加したとき、色素を添加しないコントロールと比較して細胞の増殖を抑制することが観測された。しかし全体に照射前の色素より抑制効果は弱いことがわかった。すなわち培養70時間のコントロールの細胞数を100としたとき、色素濃度0.01、0.02、0.3、1.1mg/ml添加したとき、それぞれ5、41、47、91%の抑制であった。

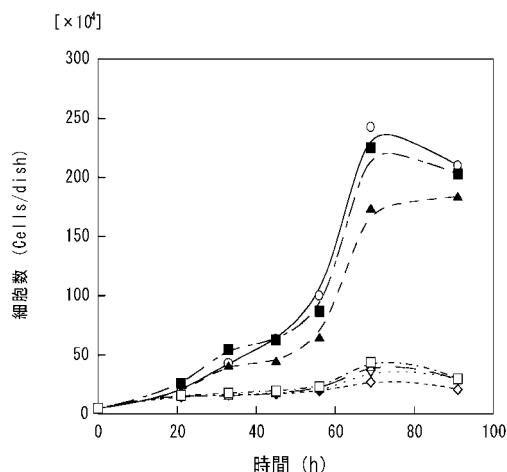


図11 色素 (Xylindein) 共存下での動物細胞増殖
○, コントロール; ■, 0.005 mg/ml; ▲, 0.01 mg/ml; □, 0.02 mg/ml; △, 0.3 mg/ml; ▽, 0.6 mg/ml; ◇, 1.1 mg/ml

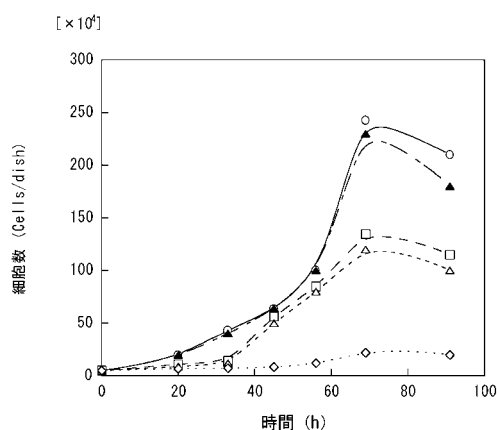


図12 紫外線照射した色素 (Xylindein) 共存下での動物細胞増殖
○, コントロール; ■, 0.005 mg/ml; ▲, 0.01 mg/ml; □, 0.02 mg/ml; △, 0.3 mg/ml; ▽, 0.6 mg/ml; ◇, 1.1 mg/ml

3. 5 腫瘍細胞 (HeLaS3) へのXLの影響

XLを添加した時のHeLaS3細胞増殖を図13に示す。XLを添加したものは、コントロールと比べて明らかに細胞増殖が抑制されていることがわかる。培養70時

間のコントロールの細胞数を100%とした時、色素濃度0.02mg/mlで51%の抑制率を示した。

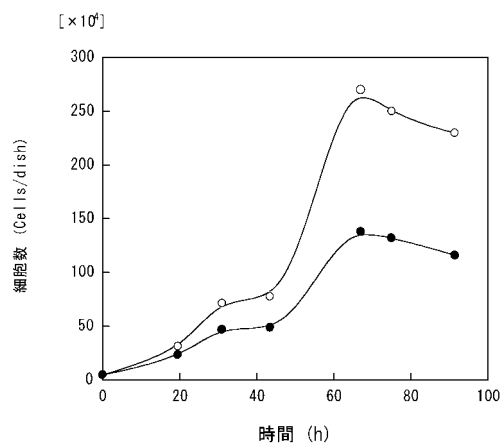


図13 XLを添加した時のHeLaS3細胞増殖
○;コントロール, ●;0.02 mg/ml

4. 結論

ロクショウグサレキン (*Chlorociboria aeruginosa* complex) からの色素 (Xylindein) を加圧熱水によって効率的に抽出することが出来ることがわかった。とくにNaOH溶液を用いると、多量に色素を得ることが出来た。Xylindeinは光によって赤紫色に変化するが、色素の基本骨格は変化せず、Xylindein構造のエノール型のプロトンが、別の物質と置換されたことにより、共役が短くなっていることが示唆された。この色素を培地に添加するとCHO細胞の増殖が抑制されることがわかった。紫外線照射した色素も抑制するが、抑制の度合いは小さくなった。

謝 辞

CHO細胞培養に関して多大なる便宜と指導を戴いた、長岡技術科学大学生物系山元浩二教授、高原美規助教授に感謝致します。また、ロクショウグサレキンの収集にご協力いただきました。松之山町滝沢博氏に感謝致します。

文 献

- 1) 高橋誠一郎、染色 α 、147、pp.61-63 (1993).
- 2) 金子周平、川端良夫、福岡県森林林業センター年報、pp.74-75 (1996).
- 3) G.M.Blackburn, A.H.Neilson and L.Todd, Proc. Chem. Soc., 3, pp.327-328 (1962).

- 4) R.L. Edwards and N. Kale, Tetrahedron, 21, pp.2095-2107 (1965) .
- 5) Y. Saikawa, T. Watanabe, K. Hashimoto and M. Nakata, Phytochemistry, 55, pp.237-240 (2000) .
- 6) T. Sakaki, M. Shibata, T. Miki, T. Hirose and N. Hayashi, Energy Fuels, 10, pp.684-688 (1996) .
- 7) 坂本剛 Bio-Industry, 15, 10, pp.28-36 (1998) .
- 8) Medentsev, A.G. and Akimenko, V.K., Prikl. Biokhim. Mikrobiol., 32 (1) , pp.10-33 (Russian) (1996) .

